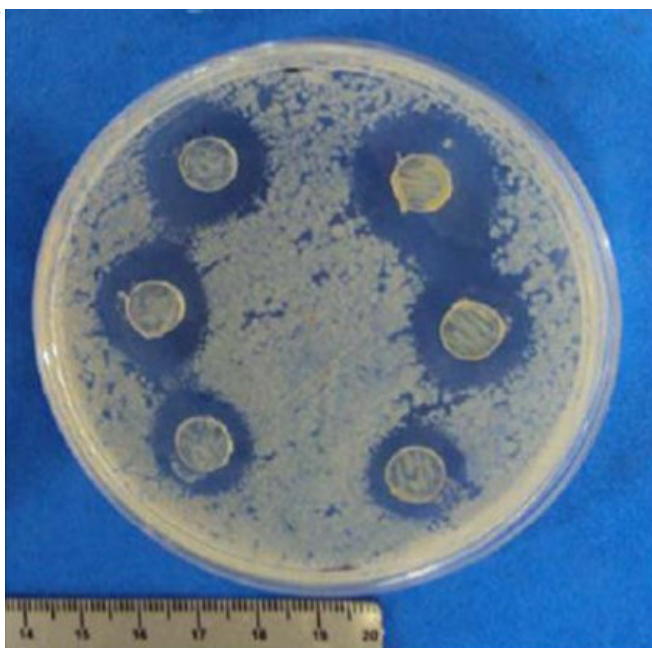


Foto: Marcela Iris Gabbay



Isolamento e Seleção De Bactérias Ácido-Láticas com Potencial Probiótico para Pirarucu

Rodrigo Yudi Fujimoto¹

Marcela Iris Gabbay²

Mauricio Laterça Martins³

Adolfo Jatobá Medeiros Bezerra⁴

Bruno Correa Silva⁵

José Luiz Pedreira Mouriño⁶

A demanda crescente do mercado mundial por proteínas de alta qualidade tem estimulado o crescimento da aquicultura. Esse crescimento ocorre pelo aumento das áreas de produção e a intensificação no sistema de criação e expõe os peixes à diversas variações ambientais provocando desequilíbrio na tríade hospedeiro-patógeno-ambiente que pode favorecer a invasão de patógenos (vírus, bactéria e parasitas) e o desenvolvimento de enfermidades resultando em perdas na produção (TORANZO et al., 2004).

Para o controle de enfermidades, vários recursos são utilizados, em especial, agentes químicos com funções antimicrobianas (antibióticos). Porém, o uso desses produtos tem resultado no desenvolvimento de cepas resistentes e acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes comercializados, além de ser uma fonte de poluição para os mananciais (BALCAZAR et al., 2006; FULLER, 1992; MORIARTY, 1999).

Uma alternativa é a utilização de probióticos que podem favorecer o crescimento dos animais cultivados e diminuir os surtos de doenças, minimizando o uso de agentes químicos, como antibióticos, melhorando a sustentabilidade da atividade (IRANTO; AUSTIN, 2002).

Esses probióticos são microorganismos que adicionados à dieta promovem melhora no aproveitamento de nutrientes e no sistema de defesa do organismo (IRANTO; AUSTIN, 2002). O uso desses organismos como probióticos na aquicultura é recente e tem mostrado resultados promissores para peixes e larvas de crustáceos (PLANAS; CUNHA, 1999). Os benefícios descritos dos probióticos adicionados à dieta são: melhora nos índices zootécnicos como maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar, além da redução da colonização intestinal por agentes patogênicos. Dentre os microorganismos já testados como probióticos na aquicultura estão: *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*

¹ Zootecnista, Doutor em Aquicultura, pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

² Bióloga, Mestre em Ciência animal, UFPA.

³ Biólogo, doutor em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

⁴ Engenheiro de Aquicultura, Doutor em aquicultura- Instituto Federal de Santa Catarina. Araquari, SC.

⁵ Engenheiro de Aquicultura, Doutor em aquicultura- Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Camboriú, SC.

⁶ Zootecnista, Doutor em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Bacillus subtilis, *Saccharomyces* spp. (BIDHAN et al., 2014; PIRARAT et al., 2009; MEURER et al., 2007), sendo uma grande quantidade dessas bactérias conhecidas como bactérias ácido láticas (BALs)

Apesar de ser uma ferramenta importante, a utilização de bactérias ácido-láticas (BALs) isoladas de espécies nativas da Amazônia, como o pirarucu, assim como seu efeito sobre essa espécie, é desconhecida.

O pirarucu é um peixe endêmico da Amazônia apresentando características que o torna grande interesse para piscicultura como seu excelente ganho de peso (em torno de 10 kg no primeiro ano), carne desprovida de espinhos, rusticidade, alto rendimento de carcaça (em torno de 57%) e alto valor comercial da carne (IMBIRIBA, 2001; SOARES; NORONHA, 2007).

Devido à importância do cultivo de pirarucu, a associação de uma medida preventiva, o probiótico, se torna uma técnica importante para a sustentabilidade da cadeia produtiva. A primeira etapa nesse processo é o isolamento e seleção de bactérias endógenas com potencial probiótico.

Para isso, seleciona-se juvenis saudáveis de *Arapaima gigas* que devem ser aclimatados em tanques cilíndricos de 310 L por 20 dias, alimentados com ração comercial. Após aclimação os peixes devem ser abatidos por choque térmico (resfriamento em mistura de gelo e água) e então lavados com álcool 70%. Em local estéril, devem ser e colocados na posição ventral para extração dos fragmentos intestinais. Posteriormente, as amostras dos órgãos são maceradas em gral de porcelana (Figura 1B), diluídas em solução salina estéril 0,65%, semeadas em meio de cultura Agar MRS (Man Rogosa Sharpe) e incubadas por 48 h a 35 °C de acordo com Jatobá et al. (2008) (Figura 1).

Em experimento realizado na Universidade Federal do Pará, em parceria com a Embrapa Tabuleiros Costeiros e a Universidade Federal de Santa Catarina, a partir dessa metodologia foram isoladas 26 cepas destas, sendo que nove não resistiram às condições laboratoriais, 13 foram descartadas pelo crescimento lento e quatro cepas (A25, A27, A30, A32) foram selecionadas para o teste in vitro.

Após o isolamento dessas cepas realiza-se o in vitro para selecionar aquelas com potencial probiótico. Esses testes consistem no teste de inibição frente a patógenos, viabilidade em meio de cultura alternativo e viabilidade na ração.

A inibição do crescimento de patógeno é efetuada por meio do método de Tagg e Mc Given (1971) adaptado por Ramirez et al. (2006). As bactérias recém crescidas em meio MRS (35 °C por 24 h) são semeadas em placas de Agar MRS e incubadas a 35 °C por 48 h. Após esse período são retirados três discos (0,8 cm de diâmetro) da placa de Agar com cepas das bactérias, sendo estes discos sobrepostos em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) com duas repetições cada, recém semeados com um dos seguintes patógenos (*Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus durans* ATCC 19492, *Escherichia coli* D363, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Micrococcus luteus* A270, sendo incubadas a 30 °C por 24 h.

O crescimento do patógeno é determinado pelo diâmetro do halo de inibição produzido ao redor do disco de ágar contendo as bactérias ácido-láticas.

Nos experimentos previamente realizados, das sete cepas patogênicas, apenas a *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (S.A) não foi inibida por nenhuma bactéria probiótica (Tabela 1).

Tabela 1. Média dos halos de inibição de crescimento (em mm) dos agentes patogênicos frente a isolados bacterianos com potencial probiótico isolados de pirarucu.

| Cepas | E. C | M.L | E.D | P.A | A.H | S.A |
|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| A27 | 0 | 13 | 12 | 12 | 10 | 0 |
| A31 | 12 | 14 | 0 | 16 | 11 | 0 |
| A25 | 15 | 0 | 0 | 15 | 11 | 0 |
| A30 | 0 | 0 | 0 | 9 | 10 | 0 |

E.C. *Escherichia coli* D363 A.H. M.L. *Micrococcus luteus* A270
E.D. *Enterococcus durans* ATCC 19492, P.A. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, A.H. *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e S.A. *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Após o teste de inibição, as bactérias isoladas do pirarucu foram identificadas por meio de provas bioquímicas API 50 CHB. As cepas foram identificadas como: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* com 99,9% de precisão (A27), um *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* com 62,7%

Fotos: Marcela Iris Gabbay



Figura 1. Isolamento de bactérias ácido láticas: A. Fragmento inteiro do intestino no gral de porcelana; B. Maceração do fragmento do órgão; C. Diluição em salina estéril e aplicação na placa de petri contendo meio MRS; D. Distribuição da amostra em toda placa de petri.

de precisão (A30) e dois *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* com 52,2% de precisão (A25, A31). Não foi encontrado registro de patogenidade destas cepas para peixes. As bactérias do gênero *Lactobacillus* aderem-se fortemente a parede intestinal, inibindo o crescimento de bactérias indesejáveis com substâncias produzidas durante a fermentação como os ácidos lático e acético (VAZQUEZ et al., 2005).

As bactérias com os melhores halos de inibição foram selecionadas para o teste de desempenho em diferentes concentrações de leite desnatado para posterior aspersão na ração (RAMIREZ et al. 2006).

Para o teste os isolados recém semeados em meio MRS (24 h a 35°C) são inoculados (1mL, 10% do volume final) em diferentes concentrações de leite e açúcar, incubadas a 35 °C por 48 h (Figura 2). Após este período é realizada uma diluição seriada (fator 1:10) em solução salina estéril 0,65% NaCl para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para bactérias isoladas do pirarucu o melhor crescimento foi da bactéria *Lactobacillus paracasei* em 90 g/ L de leite e 20 g de açúcar apresentando concentração mínima de $3,4 \times 10^8$ UFC/mL.

Fotos: Marcela Iris Gabbay

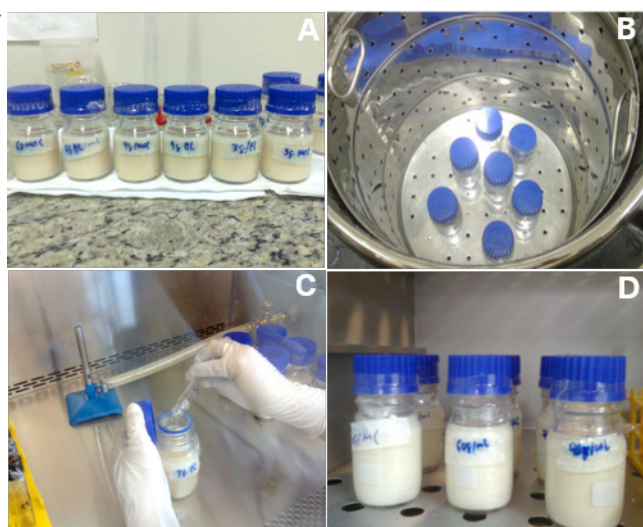


Figura 2. Teste de crescimento em leite; A. Diferentes concentrações de leite; B. frascos de leite autoclavados, C; bactéria probiótica inoculada no leite; D. frascos com leite na estufa a 35° C.

A última etapa da seleção in vitro é a avaliação da bactéria ácido-lática na ração. Para isso a bactéria é cultivada na concentração determinada na etapa anterior e então aspergida na concentração de 100 mL/Kg de ração (40% de proteína bruta, ração extrusada). Após a aspersão a ração é acondicionada em bandejas hermeticamente fechadas e incubadas em estufa a 35 °C por 24 h, para posterior secagem a 30 °C por 24 h.

Um grama da amostra dessa ração é então macerada em gral de porcelana com 1 mL de solução salina estéril,

sendo realizada cinco diluições seriadas com fator de 1:10 (MADIGAN et al., 2004). Sendo essas diluições (10^{-4} a 10^{-8}) semeadas em meio Agar MRS e incubadas em estufa a 35 °C por 48 h para verificar a concentração das bactérias ácido-láticas na ração.

Com as bactérias isoladas de pirarucu evidenciou-se a viabilidade no uso da bactéria *Lactobacillus paracasei* cuja concentração na ração suplementada apresentou $5,65 \times 10^6$ UFC/g de ração. Os resultados obtidos no teste de viabilidade da ração permite a estocagem da ração após a adição do probiótico por um período de 13 dias.

Considerações finais

A bactéria ácido láctica *Lactobacillus paracasei* isolada de pirarucu apresenta potencial probiótico em testes in vitro. Ensaios in vivo específicos para a espécie devem ser realizados para verificar os efeitos no desempenho e sanidade causado pela suplementação.

Referências

- BALCAZAR, J. L. et al. The role of probiotics. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173-186, 2006.
- BIDHAN, C. de; MEENA, D. K.; BEHERA, B. K.; PRONOB das, MOHAPATRA P. K. das MOHAPATRA, SHARMA, A. P. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, v. 3, p. 921-971, 2014.
- FULLER, R. A. Review probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.
- IMBIRIBA, E. P. Potencial de criação de pirarucu (*Arapaima gigas*), em cativeiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 3, p. 299 - 316, 2001.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in Aquaculture: review. **Journal of Fish Diseases**. v. 25, p. 633-642, 2002.
- JATOBÁ, A. M. et al. Utilização de bactérias ácido lácticas isoladas de trato intestinal de tilápia do Nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 1201-1207, 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall. 2004. 608p.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M.; FRECCIA, A.; MAUERWERK, M. T. Saccharomyces cerevisiae como probiótico para alevinos de tilápia-do-Nilo submetidos a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1219-1224, 2007.

MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Canadá: Microbial Interactions in Aquaculture, 1999. p. 1-7.

PLANA, M.; CUNHA, I.. Larviculture of marine fish: problems and Perspectives. **Aquaculture**, v. 177, p. 171-190, 1999.

PIRARAT, N.; PINPIMAI, K.; CHANKOW, K.; MALILA, K.; CHANSUE, N.; NIYOMTHAM, W.; RODKHUM, C. In Vitro Efficacy of Human-Derived Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* Against Pathogenic Bacteria in Fish and Frogs. **The Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 4, p. 305-310, 2009.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, G. A.; CIFFONI, G. A.; PANCHENIAK, E. M. G.; SOCCOL, E. F. R. C. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicadas en la de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v. 264, p. 70 - 78, 2006.

SILVA, B. C. **Septicemia hemorrágica em surubim híbrido (Pseudoplatystoma coruscans macho X P. fasciatum fêmea) causada por Aeromonas hydrophila**. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

SOARES, M. C. F.; Noronha, E. A. P. Pirarucu, Arapaima gigas: uma revisão bibliográfica visando a Aquicultura sustentável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados.. **Anais...** Dourados, 2007. Disponível em: < <http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/Pirarucu%20potencial%20para%20a%20piscicultura.pdf> >. Acesso em: 1 dez. 2014.

TORANZO, A. E.; BARJA, J. L.; DOPAZO, C. P.; ROMALDE, J. L. Enfermedades bacterianas y víricas de peces marinos. In: RANZANI-PAIVA, M. J., TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004, p. 03-52.

VAZQUEZ, J. A.; GONZALEZ, M. P.; MURADO, M. A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v. 245, p. 149-161, 2005.

Comunicado Técnico, 148

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

www.embrapa.br/fale-conosco

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF

1ª edição

On-line (2014)

Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes

Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Membros: Alexandre Nizio Maria, Ana da Silva Léo,
Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo,
Hymerson Costa Azevedo, Josué Francisco da Silva
Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini
e Walane Maria Pereira de Mello Ivo.

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Editoração eletrônica: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues